Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

Anti-HBs und Anti-HBc in HBs-Ag negativen Blutspendern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
BRIGITTE EWALD
aus Görlitz

1981

Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

Anti-HBs und Anti-HBc in HBs-Ag negativen Blutspendern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
BRIGITTE EWALD
aus Görlitz

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. G. Rassner

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Schneider

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7

ANTI-HBs UND ANTI-HBc IN HBs-AG NEGATIVEN BLUTSPENDERN

A. INSTRUKTIONEN

Auf der Suche nach dem Erreger der Hepatitis B wurden erst das HBs-Antigen, das anti-HBs und später das sogenannte Dane-Partikel gefunden. Es gilt als weitgehend gesichert, daß es sich beim Dane-Partikel um das Hepatitis B-Virus handelt, obwohl dieses noch bewiesen werden muß. (1)

Ein weiteres Antigen-Antikörper-System wurde von Magnius und Espmark in HBs-Ag-haltigen Seren gefunden, das seither als das "e-System" bezeichnet wird (HBe-Antigen und anti-HBe). (17)

Das Dane-Partikel hat einen Durchmesser von 42 nm, besteht aus einem inneren Kern (-core-) und einer äußeren Hülle (-surface). Diese Determinanten werden als Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBs-Ag) und Hepatitis B-Core-Antigen (HBc-Ag) bezeichnet. (7)

Während akuter oder chronischer Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus tritt HBs-Ag in großen Mengen als überschüssiges Hüllprotein im Blut auf, und zwar vorwiegend als 22 nm große sphärische Partikel. Im Gegensatz dazu wurde HBc-Ag außerhalb des Dane-Partikels nur in Kernen von infizierten Hepatocyten gefunden und nicht freizirkulierend im Serum.

Experimentelle Beobachtungen fanden heraus, daß die komplizierten inneren Core-Strukturen des Dane-Partikels mit einer spezifischen DNA-Polymerase (Enzymen) und einem kleinen runden doppel-strängigen DNA-Molekül verbunden sind. Die darauffolgenden sero-epidemiologischen Untersuchungen etablierten eine Verbindung zwischen vermuteter viraler Replikation und der Gegenwart HBV-spezifischer DNA-Polymerase und späteren Entdeckung von Antikörpern zum Core-Antigen. (14)

In einer Studie von C.R. Howard und A.J. Zuckermann 1977 (12) wurde das Core-Antigen isoliert und als Nucleinprotein identifiziert mit einer Dichte von 1,36 g/cm^3 und einem isoelektrischen Punkt von 4,4.

Für das Hepatitis B-Surface-Antigen sind zehn eindeutig definierte HBs-Ag-Subtypen bekannt mit zumindest fünf unterscheidbaren Haupt-Determinanten. Die gruppenspezifische Determinante wird mit dem Buchstaben a bezeichnet, die Determinanten d oder y sowie w oder r sind jeweils alternativ vorhanden. Für Mitteleuropa ist die Differenzierung der Subtypdeterminanten d bzw. y am wichtigsten. (5)

Beim Hepatitis B-Core-Antigen fand man bis jetzt noch keine Subtypen.

Das Auftreten von anti-HBs entspricht einer erfolgten Auseinandersetzung des Organismus mit HBs-Ag und stellt eine Immunantwort desselben dar, diese bedeutet das sichere Ende der Infektiosität und das Ende der Krankheit. Man geht davon aus, daß anti-HBs eine Immunologische Schutzfunktion ausübt, was besonders Mitarbeitern in exponierten Tätigkeitsbereichen der Klinik zugute kommt. (6)

In der Bundesrepublik Deutschland werden bei der Normalbevölkerung mit zunehmendem Alter mehr anti-HBs-Träger gefunden. (7)

Anti-HBc entwickelt sich regelmäßig während einer Infektion mit dem Hepatitis B-Virus und ist so ein Indikator entweder für eine früher durchgemachte akute oder eine chronische Infektion. (4)

Wie von Hoofnagle et al und Krugmann beschrieben, wird anti-HBc bei HBV-Infektionen im Serum kurz vor dem Erscheinen von klinischen Symptomen gefunden, ebenso während derselben. Antikörper gegen HBc-Ag werden früher produziert als Antikörper gegen HBs-Ag. (8)

Nach durchgemachter HBV-Infektion wird ein Abfallen des anti-HBc Titers beobachtet, ebenso eine kürzere Persistenz des anti-HBc als von anti-HBs. (2)

Nach Studien von G.N. Vyas et al bleibt anti-HBc ungefähr 2 Jahre nach der akuten Erkrankungsphase nachweisbar. So werden Antikörper gegen HBc-Ag also nicht nur während der akuten und chronischen Infektion gefunden, sondern auch während der Genesungsphase und lange danach, deshalb ist deren Auffinden der empfindlichste Indikator einer akuten, einer früher durchgemachten oder einer chronischen HBV-Infektion. (11)

In der vorliegenden Studie wird die Frage untersucht, wie die Verhältnisse unter den freiwilligen Tübinger Blutspendern sind, und zwar nach den Kriterien Frequenzen und Altersverteilung von anti-HBs und anti-HBc bei ca. 3000 HBs-Ag negativen Blutspendern.

B. PROBANDEN UND METHODEN

Im Zeitraum von vier Monaten (August-November 1977) wurden 3150 Serumproben in der Blutzentrale der Universität Tübingen gesammelt, und zwar solche, die im Routinetest durch AUSRIA II-125 negativ für HBs-Ag waren. Nach Elimination von Spenderproben, die in diesem Zeitraum mehrmals gespendet hatten, verblieben noch 2947 Proben. Diese Proben wurden im folgenden auf anti-HBs und anti-HBc untersucht.

1. Suchteste

1.1 für anti-HBs

Für das Auffinden von anti-HBs wurde der Radioimmunassay AUSAB^{R} der Fa. Abbott Laboratoires benutzt.

Das AUSAB Ria-System gebraucht gereinigtes HBs-Ag, das beide Subtypen a d w und a y w enthält und ähnlich gereinigt ist, wie das mit ^{125}J markierte HBs-Ag, das den Indikator darstellt.

Dieses AUSAB-System verwendet zur Bestimmung der anti-HBs-Levels im Serum oder Plasma ein "Sandwich Prinzip", einen "solid phase"-Radioimmunassay. Die Testpackung enthält Polystyrolkugeln, die mit humanem Hepatitis B-(Surface-) Antigen beschichtet sind. Bei Inkubation mit Patientenserum werden Antikörper, sofern vorhanden, an das "solid phase"-Antigen gebunden. Wird hierzu nun ^{125}J-markiertes Antigen zugegeben, verbindet es sich mit den Antikörpern auf den Polystyrolkugeln und bildet somit ein radioaktives Antigen-Antikörper-Antigen "Sandwich".

1.2 für anti-HBc

Auch für das Auffinden von anti-HBc im Probandenserum wurde der neu entwickelte Radioimmunassay CORAB^{R} der Fa. Abbott benutzt. Der CORAB-Test basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Hemmung zwischen mit ^{125}J markierten

anti-HBc und eventuell vorhandenem anti-HBc im Serum oder Plasma auf mit Hepatitis B-Core-Antigen beschichteten Polystyrolkugeln. Ist nun anti-HBc im zu untersuchenden Serum, wird nur wenig ^{125}J markiertes anti-HBc auf den Kugeln gebunden. Daraus ergibt sich: Je größer die Menge von anti-HBc in einer Probe, um so niedriger die Endzählrate der Kugeln.

2. Bestimmungsmethoden der Titer

2.1 Titer von anti-HBs

Alle im Screening für anti-HBs positiven Seren wurden in einem neuen Durchgang mit doppeltem Ansatz getestet.

Von den aus dem Screening erhaltenen Impulsen/Minute wurden zuvor die RIA-Faktoren nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RIA-F} = \frac{\text{Probe (Imp./Min)} - \text{LW}\bar{x} \text{ (Imp./Min)}}{\text{NK}\bar{x} \text{ (Imp./Min)} - \text{LW}\bar{x} \text{ (Imp./Min)}}$$

$\text{LW}\bar{x}$ = Mittelwert der Leerwerte
$\text{NK}\bar{x}$ = Mittelwert der negativen Kontrollen

Seren mit einem RIA-Faktor über 200 wurden 1:1000
mit einem RIA-Faktor von 100 - 200 wurden 1:100
mit einem RIA-Faktor von 20 - 100 wurden 1:10
verdünnt,
mit einem RIA-Faktor unter 20 unverdünnt wiederholt.

Als Verdünnungsmedium diente ein Serumpool von fünf HBs-Ag-, anti-HBs- und anti-HBc negativen Blutspendern.

In der Anleitung zur Durchführung der semi-quantitativen Bestimmung von anti-HBs wird folgendes Verfahren von Abbott beschrieben:
Das AUSAB^{R}-Verfahren wurde dazu benutzt, verschiedene Konzentrationen positiver Kontrollen zusammen mit Hauptchargen der Reagenzien zu untersuchen. Daraus entstand

eine Tabelle zur Schätzung der anti-HBs-Konzentrationen in unbekannten Proben. Der geschätzte Wert der "RIA-Einheit" wird bestimmt, indem man das Verhältnis der Reaktivität der unbekannten Probe zur positiven Kontrolle berechnet und zuvor von beiden Werten den Mittelwert der negativen Kontrolle substrahiert. Dieses Verhältnis wird mit Z bezeichnet.

$$\text{Verhältnis } Z = \frac{\text{Probe (Imp./Min)} - \overline{NK}\ \text{(Imp./Min)}}{\overline{PK}\ \text{(Imp./Min)} - \overline{NK}\ \text{(Imp./Min)}}$$

$\overline{NK}$ = Mittelwert der negativen Kontrollen
$\overline{PK}$ = Mittelwert der positiven Kontrollen

Aus einer aufgestellten Tabelle erhält man für Z den geschätzten Wert der RIA-Einheit. (In Figur 1 ist diese Tabelle graphisch aufgetragen). In besagter Tabelle stehen links die Z-Werte (obige Quotienten) und rechts die "geschätzten RIA-Einheiten" für die entsprechenden Quotienten. Gehen die Werte der errechneten Z-Werte über die in der Tabelle hinaus, muß man die entsprechende Probe verdünnen, Z neu berechnen und die angewendete Verdünnung bei der Endberechnung berücksichtigen. Um nun die ungefähre Verdünnung einer Probe zu erhalten, in der anti-HBs mit Hilfe von AUSAB^{R} gerade noch nachgewiesen werden kann, benutzt man folgende Formel:

geschätzte RIA-Einheiten / 16 = geschätzter Verdünnungs-Titer der Probe.

Soweit die Anleitung von Abbott.

Der Versuch, die Bestimmung von Proben mit bekanntem Titer (d.h. Endpunkt-Titer über geometrische Verdünnungsreihe), über die geschätzten RIA-Einheiten zu verifizieren, bestätigte dieses Verfahren nicht, so daß der im folgenden beschriebene Weg eingeschlagen wurde:
Nicht die Beziehung zwischen Z-Werten und geschätzten RIA-Einheiten wurde in Zusammenhang gestellt, sondern die Z-Werte in Beziehung zu den verwendeten Verdünnungsstufen.

Versuchsablauf:

Von fünf Seren, positiv für anti-HBs und bekannten hohen, mittleren und niedrigen Titer (Endpunkt-Titer über geometrische Verdünnungsreihe) wurden Verdünnungsreihen erstellt mit je zwei Wiederholungen und aus den sich ergebenden Impulsen/Minute der Mittelwert $\bar{x}$ genommen. Setzt man diese Impulswerte in die Gleichung für Z ein, so sollten die erhaltenen Werte zwischen 0,02 und 1,0 liegen. Ist dies nicht der Fall, muß man entsprechend verdünnen, d.h. so verfahren, wie oben schon beschrieben. Die Abhängigkeit dieser nunmehr in den Schaubildern als y-Werte bezeichneten Z-Werte von den Verdünnungsstufen wurde von jeder Probe in einem Schaubild dargestellt (Figur 2-6).

Betrachtet man diese Schaubilder im Vergleich, so erkennt man in allen fünf Fällen einen Kurvenverlauf von auffallend ähnlicher Art. Es handelt sich sozusagen um eine Kurvenschar, der eine einheitliche Gesetzmäßigkeit zugrunde liegt, d.h. also, daß die Abhängigkeit der y-Werte von den Verdünnungsstufen vermutlich sogar in mathematischer Form durch eine Funktionsgleichung ausgedrückt werden kann. Sucht man nach einem derartigen Ansatz, so muß man die auf empirischem Weg gefundenen Kurven (Figur 2-6) mit den Schaubildern von bekannten mathematischen Funktionen vergleichen.

Bei unserem Kurvenverlauf kommen zwei Möglichkeiten von Funktionsarten mit vergleichbaren Graphen in Frage, nämlich Potenzfunktionen mit negativen Exponenten und Exponentialfunktionen mit negativen Exponenten.

Die Rechtfertigung solchen Ansatzes zeigt sich natürlich nur dann, wenn die empirisch gefundenen Werte mit den aus der aufgestellten Funktionsgleichung errechneten mit genügender Annäherung übereinstimmen. Außerdem ist bei den verschiedenen Möglichkeiten der Ansatz vorzuziehen, der die bessere Annäherung liefert.

Ist die Annäherung genügend gesichert, so ist natürlich der mathematische Ausdruck der Abhängigkeit, d.h. die Funktionsgleichung, weit handlicher als eine Bestimmung der Titerstufen über die geometrische Verdünnungsreihe, die vor allem auch weit aufwendiger wäre.

Im folgenden wurden die beiden oben genannten Ansätze mit einer Potenz- bzw. Exponentialfunktion durchgeführt.

2.11 Potenzfunktion

Die graphischen Darstellungen unserer Testserie in Figur 2-6 gleichen einer Kurvenschar von Potenzfunktionen mit gleichem Exponenten, deren einzelne Kurven durch eine affine Abbildung mit verschiedenem Affinitätsverhältnis auseinander hervorgehen.
Somit liegt der Ansatz einer Funktionsgleichung der Form

$$y = ax^{-b} = a(\frac{1}{x})^b \qquad (b > 0)$$

nahe mit dem Scharparameter a und Konstantem b. Die x-Werte sind dabei die Verdünnungsstufen 100, 200, 400 bzw. 10, 20, 40... bzw. 1,2,4,8... .

Berechnet man die tatsächlichen Werte für a und b aus den Wertetafeln der fünf Seren, die auf den Schaubildern aufgeführt sind, so ergeben sich folgende Gleichungen:
(Persönliche Mitteilung von Dr. U. Sugg)

Serum B. $y = 105{,}469184 \; x^{-0{,}928377256}$

K. $y = 8{,}437589638 \; x^{-0{,}865944961}$

W. $y = 0{,}947690709 \; x^{-0{,}904779957}$

B. $y = 0{,}817555354 \; x^{-0{,}960989187}$

Kr. $y = 0{,}527050968 \; x^{-1{,}143523704}$

hieraus Mittelwert für $\bar{b}_1 = -0{,}960723013$

mit Standartabweichung $s = \pm 0{,}107906114$

und Variationskoeffizient $V_K = 11{,}23\ \%$

Aus einem zweiten Test ergibt sich für dieselben Verdünnungskurven, die mit einer anderen Antikörper-Charge durchgeführt wurden,

ein $\bar{b}_2 = -0{,}891673766$

mit $s = \pm 0{,}108320680$

und $V_K = 12{,}5\ \%$

Beide Teste gemittelt ergeben ein $\bar{b} = -0{,}926198390$

Die im Vergleich beider $\bar{b}$ sich zeigenden minimalen Abweichungen erlauben die Feststellung, daß die Bestimmung des $\bar{b}$ chargenunabhängig ist und somit, einmal festgelegt, für Titerbestimmungen großer Serien verwendet werden kann.

2.12 Exponentialfunktion

Die andere Möglichkeit ist, die bekannten Titer der fünf Proben durch eine Exponentialfunktion

$$y = a \cdot e^{-bx} \qquad (b>0)$$

anzunähern mit dem Scharparameter a und konstantem Wert b.

Bestimmt man nach diesem Ansatz wieder die Werte für a und b aus den Wertetafeln der fünf Seren, so erhält man fünf verschiedene Faktoren a und ebenfalls fünf Werte für b, die sich kaum voneinander unterscheiden.

Dieser Testansatz wurde zweimal durchgeführt unter Verwendung von verschiedenen Antikörper-Chargen und mit denselben Verdünnungsstufen.

Anstatt das ganze Zahlenmaterial der beiden Läufe aufzuführen, beschränke ich mich auf die Angabe der beiden Mittelwerte für $\bar{b}$:

1. Lauf $\bar{b}_1 = -0{,}654379001$
   mit $s = \pm 0{,}036996797$ und $V_K = 5{,}65\ \%$
2. Lauf $\bar{b}_2 = -0{,}642810$
   mit $s = \pm 0{,}042804$ und $V_K = 6{,}66\ \%$

Beide Teste gemittelt ergeben ein $\bar{b}$ von 0,648595 und somit die Funktionsgleichung

$$y = a_i \cdot e^{-0,648595x} \quad (i = 1,2...5)$$

Bei der Durchführung der ganzen Testserie mit diesen Gleichungen ergaben sich fast genau dieselben Wertepaare für x und y wie bei der Potenzfunktion.

Um nun die Konzentrationen von anti-HBs in den fünf Seren zu bestimmen, muß die jeweilige Kurve, die sowohl durch eine Potenz- als auch durch eine Exponentialfunktion ausgedrückt werden kann, noch mit der Geraden geschnitten werden, die dem

$$\text{Grenzwert} \quad \frac{2,1 - NK\bar{x} - NK\bar{x}}{PK\bar{x} - NK\bar{x}} \quad \text{entspricht.}$$

$NK\bar{x}$ = Mittelwert der negativen Kontrollen (Imp./Min)
$PK\bar{x}$ = Mittelwert der positiven Kontrollen (Imp./Min)

Zusammenfassend ist zu sagen, daß grundsätzlich beide Möglichkeiten (Potenz- und Exponentialfunktion) gerechtfertigt sind, da sie bei der Durchrechnung gleich gute Annäherungen an die bereits bekannten Titerstufen ergaben.

Ich habe mich also im folgenden auf die Potenzfunktion beschränkt.

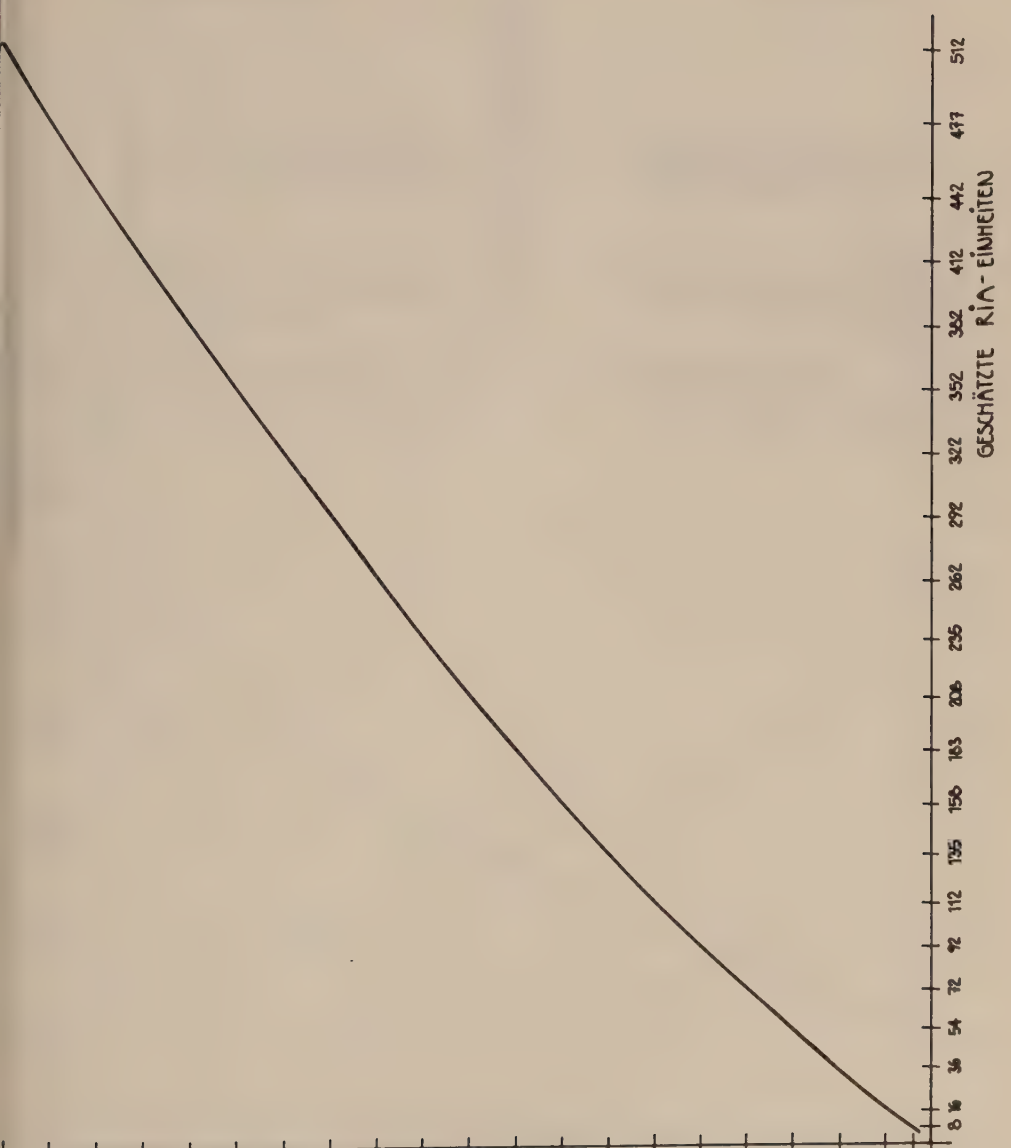
Für die Seren, die sich im Screening-Test als positiv für anti-HBs ergaben, wurden also, anstatt nach der Methode der Fa. Abbott vorzugehen, die Titer bestimmt mit dem Ansatz der Potenzfunktionen

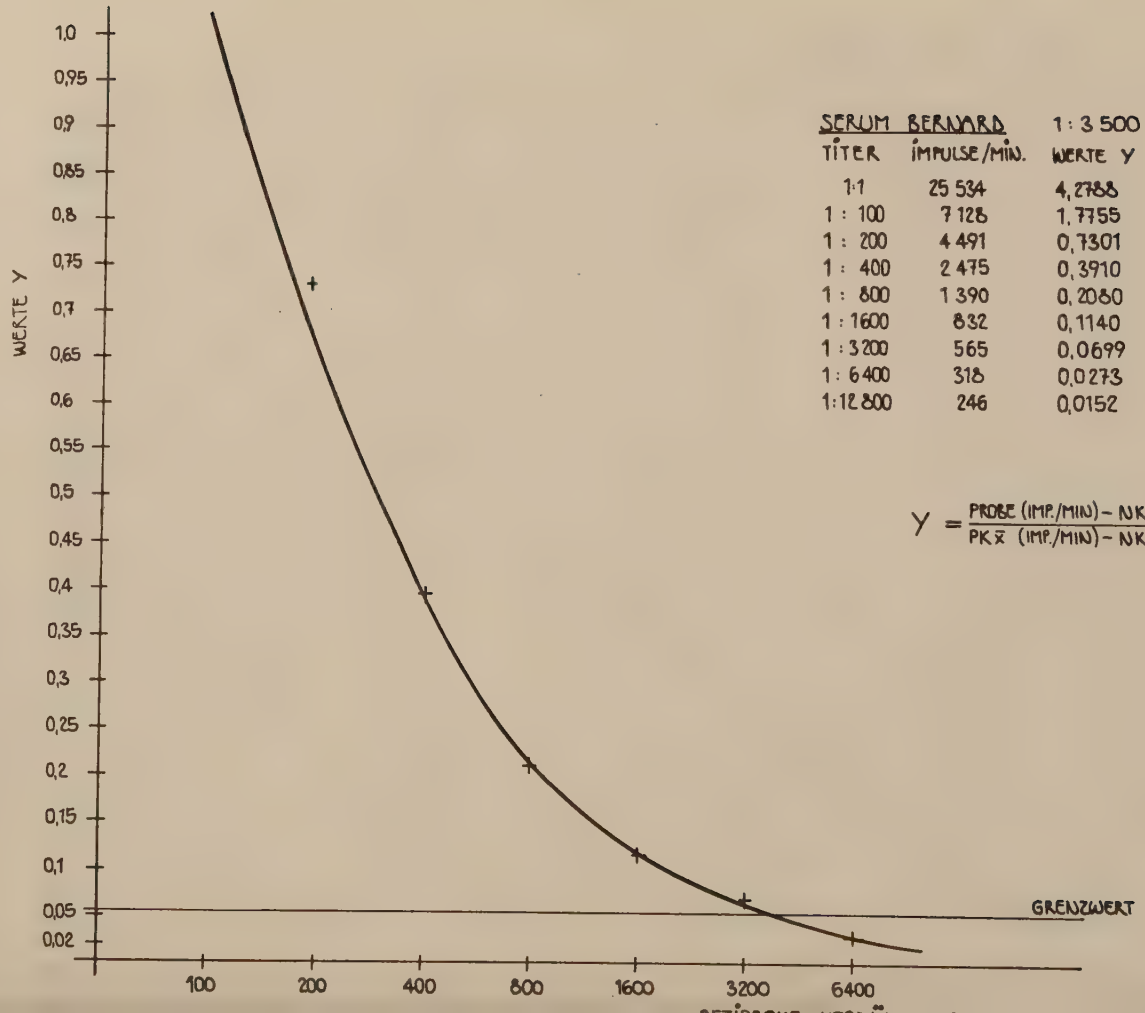
$$y = a \cdot x^{\bar{b}}$$

mit dem in 2.11 berechneten $\bar{b} = -0,926198390$.

Wie bereits erwähnt, hatte bei den fünf Proben mit vorher bekannten Titerhöhen die Berechnung der Titer durch diesen Ansatz eine sehr gute Übereinstimmung mit den in üblicher Weise erstellten Titern (Endpunkt-Titer aus geometrischer Verdünnungsreihe) ergeben.

FIGUR NR. 1

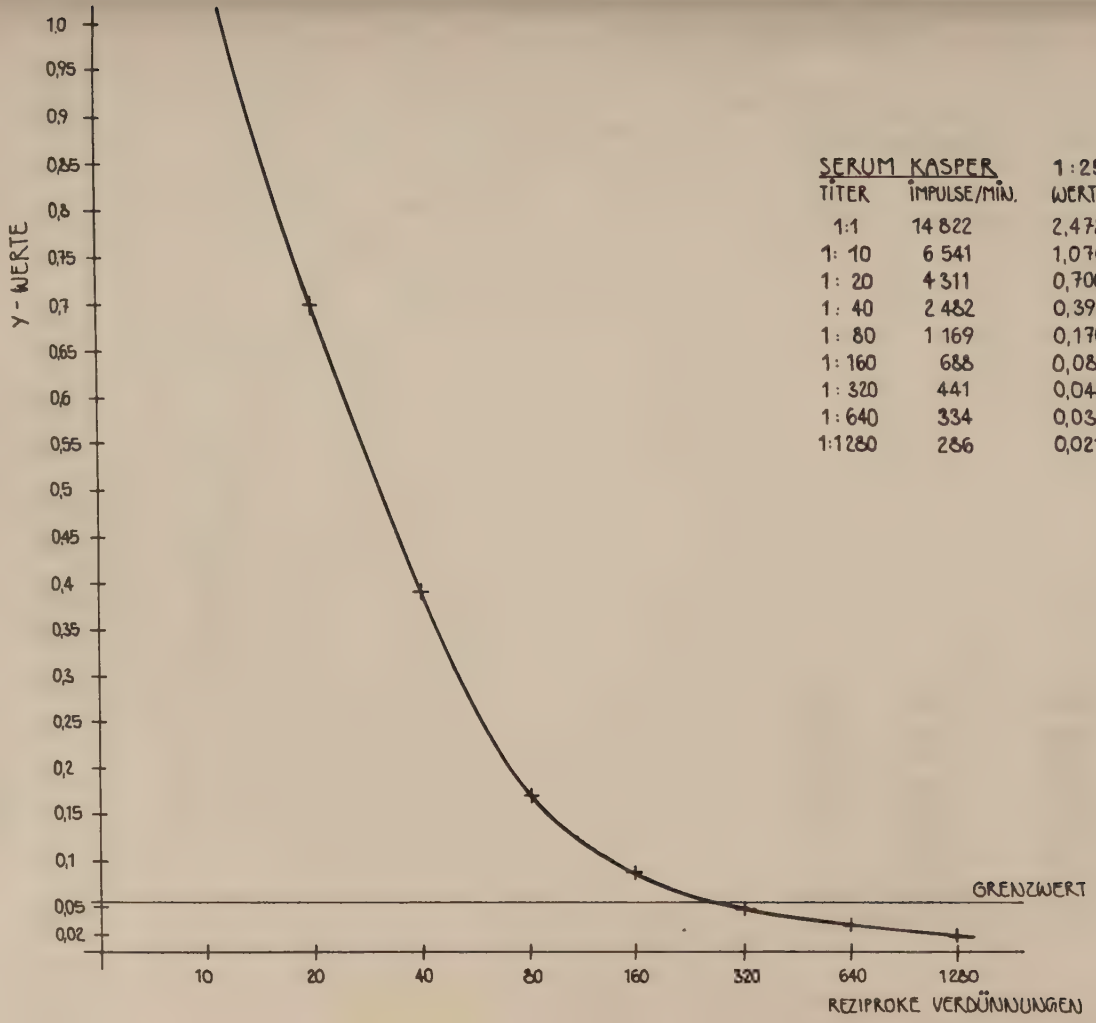

PROBE (IMP/MIN) - NKX (IMP/MIN)
PKX (IMP/MIN) - NKX (IMP/MIN)
1,0
0,95
0,9
0,85
0,8
0,75
0,7
0,65
0,6
0,55
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0,02
8 16 36 54 72 92 112 135 156 183 206 235 262 292 322 352 382 412 442 477 512
GESCHÄTZTE RIA-EINHEITEN



SERUM BERNARD		1 : 3 500
TITER	IMPULSE/MIN.	WERTE Y
1:1	25 534	4,2788
1 : 100	7 128	1,7755
1 : 200	4 491	0,7301
1 : 400	2 475	0,3910
1 : 800	1 390	0,2080
1 : 1600	832	0,1140
1 : 3200	565	0,0699
1 : 6400	318	0,0273
1:12 800	246	0,0152

$$Y = \frac{\text{PROBE (IMP./MIN)} - \text{NK}\,\bar{x}\ \text{(IMP./MIN.)}}{\text{PK}\,\bar{x}\ \text{(IMP./MIN)} - \text{NK}\,\bar{x}\ \text{(IMP./MIN.)}}$$

FIGUR NR. 2



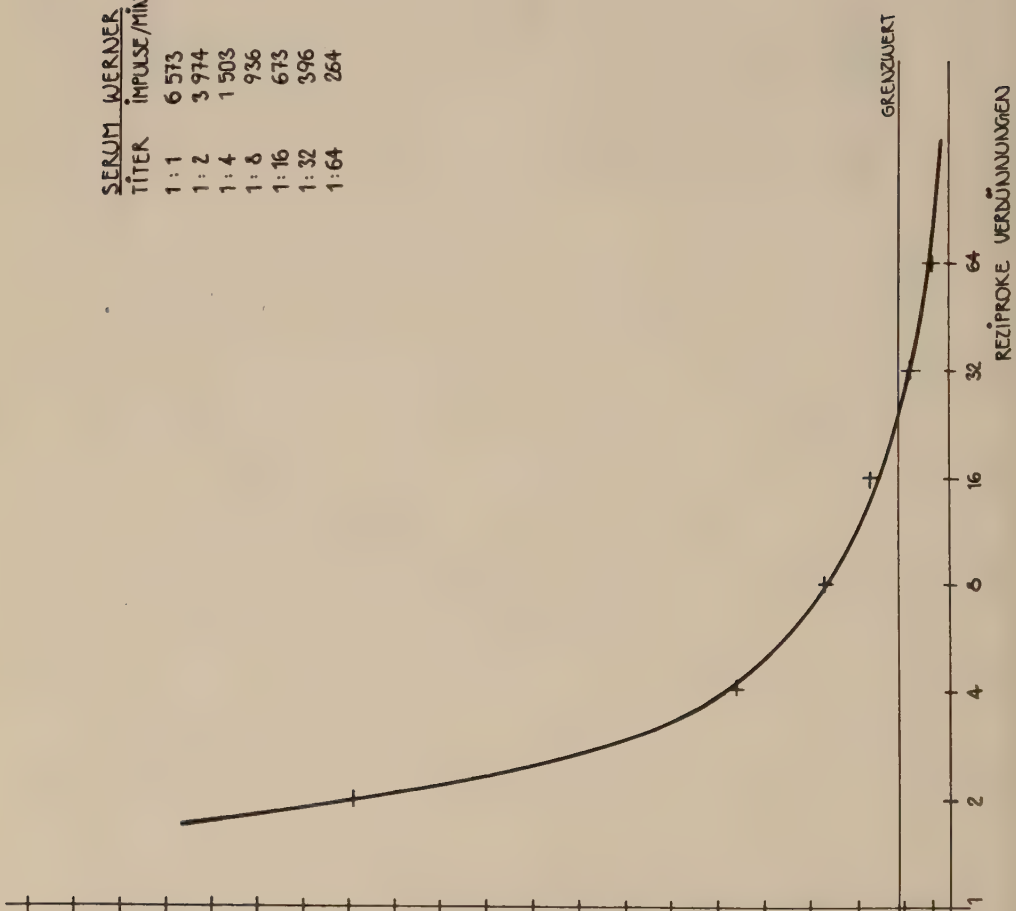
SERUM KASPER 1:250

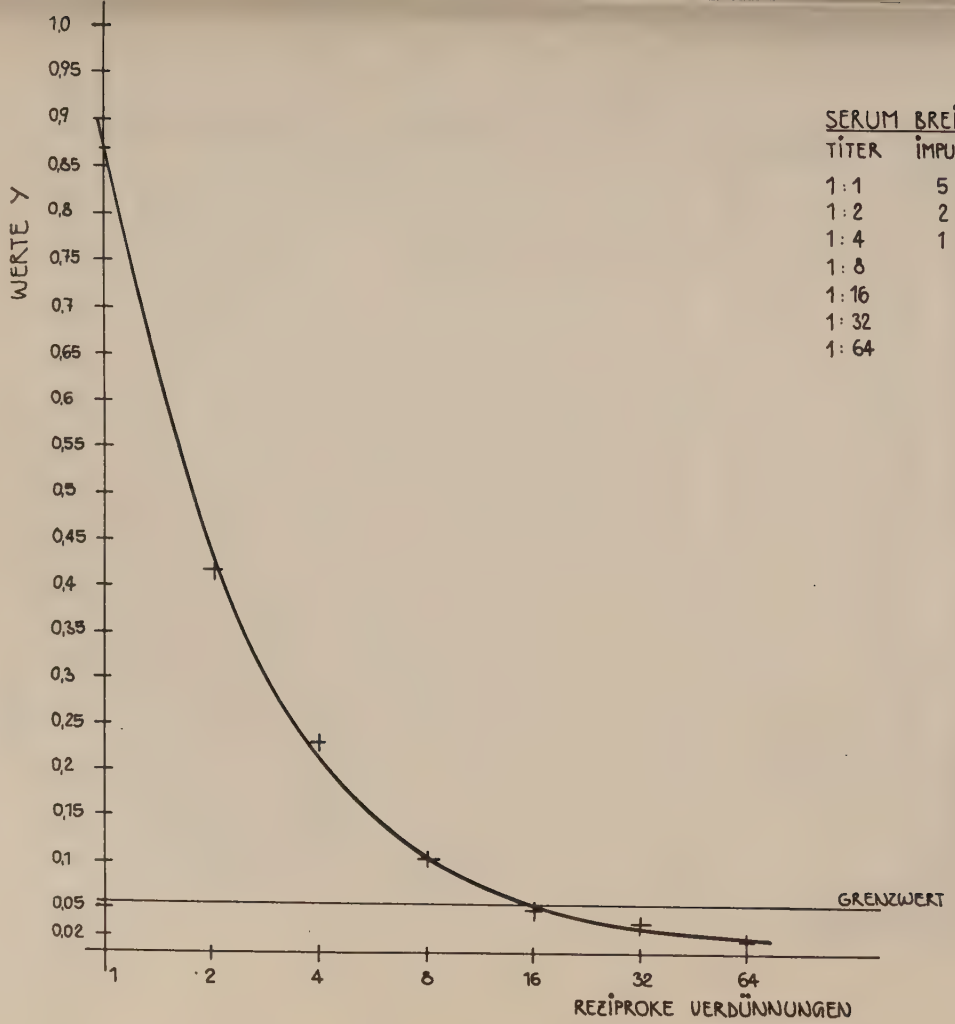
TITER	IMPULSE/MIN.	WERTE Y
1:1	14 822	2,4727
1: 10	6 541	1,0765
1: 20	4 311	0,7005
1: 40	2 482	0,3922
1: 80	1 169	0,1708
1: 160	688	0,0897
1: 320	441	0,0480
1: 640	334	0,0300
1:1280	286	0,0219

FIGUR NR. 3

FIGUR NR. 4

SERUM WERNER TITER	IMPULSE/MIN.	1:25 WERTE Y
1:1	6 573	1,0819
1:2	3 974	0,6437
1:4	1 503	0,2271
1:8	936	0,1315
1:16	673	0,0871
1:32	396	0,0404
1:64	264	0,0182

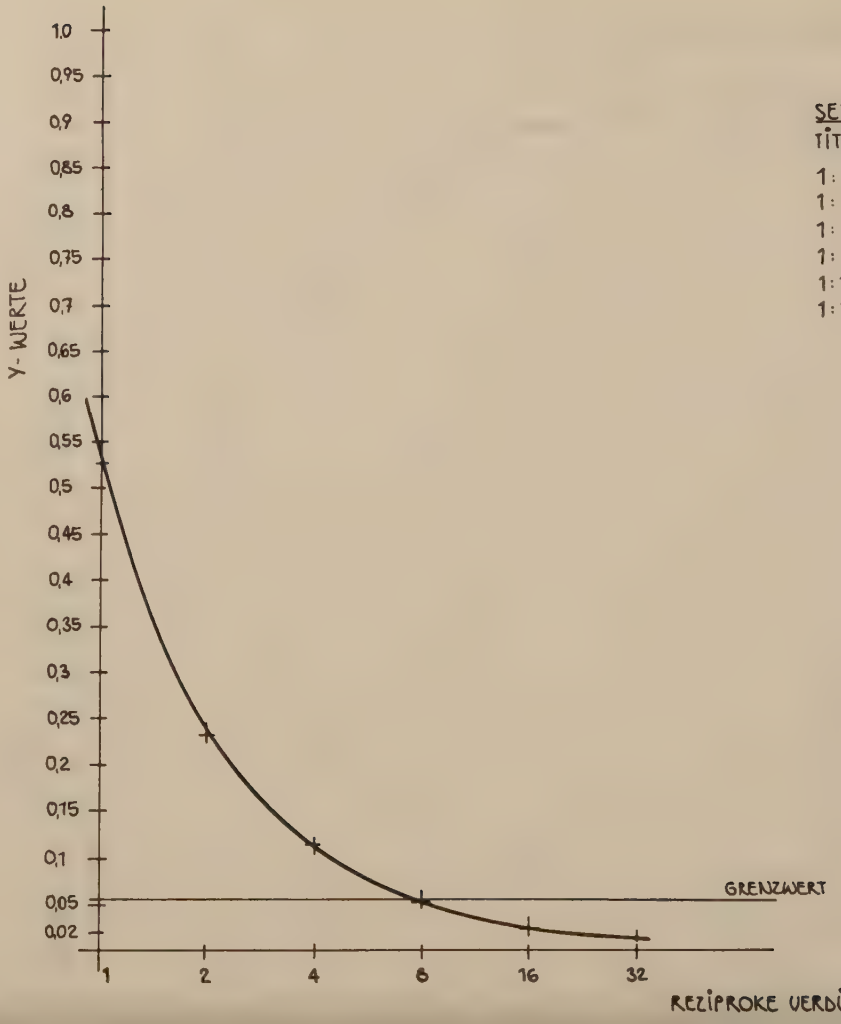




SERUM BREISINGER 1:16

TITER	IMPULSE/MIN	WERTE Y
1:1	5 292	0,8659
1:2	2 615	0,4146
1:4	1 515	0,2291
1:8	759	0,1016
1:16	421	0,0447
1:32	373	0,0366
1:64	230	0,0125

FIGUR NR. 5



SERUM KRÄMER		1:7
TITER	IMPULSE/MIN.	WERTE Y
1:1	3 273	0,5255
1:2	1 517	0,2294
1:4	826	0,1129
1:8	458	0,0509
1:16	282	0,0212
1:32	230	0,0125

FIGUR NR. 6

2.2 Titer von anti-HBc

Bei dieser Titerbestimmung korrelierte die angegebene Methode der Fa. Abbott sehr gut im Vergleich mit der herkömmlichen Methode der Verdünnungsreihe, so daß diese bei der Ermittlung der Titer aus dem Screening-Test verwendet wurde.

2.21 Durchführung des Tests zur semi-quantitativen Bestimmung von anti-HBc mit CORAB der Fa. Abbott:

Es werden folgende Verdünnungsserien von jeder Probe in negativem Kontrollserum (Pool I) erstellt:

Verdünnung:

1:10	15 µl der Probe	in 135 µl Pool I
1:100	15 µl der 1:10 Verdünnung	in 135 µl Pool I
1:1000	15 µl der 1:100 Verdünnung	in 135 µl Pool I

Peinlich genaueste Handhabung beim Anfertigen der Verdünnungsreihen ist Voraussetzung, um einwandfreie und damit verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

Jede Verdünnung wurde zweimal durchgeführt, außerdem noch fünf negative und fünf positive Kontrollen.

Eine Erfahrung sei noch am Rande erwähnt, die den Durchführungsanweisungen der Fa. Abbott widerspricht: es wird angegeben, daß zur Erstellung der Verdünnungen als Verdünnungsmedium Serum, Plasma oder rekalzifiziertes Plasma benutzt werden kann. Es muß dahingehend korrigiert werden, daß man zwar Serum und rekalzifiziertes Plasma benutzen kann, aber keineswegs nur Plasma, da sonst beim Mischen mit Probanden-Serum durch Fibrinausfall (Rekalzifizierung des Verdünnungsplasmas durch das Probandenserum) eine Verfestigung des Ansatzes eintritt und somit der ganze Verdünnungsansatz unbrauchbar wird.

Ergebnisse des semi-quantitativen Verfahrens:

Der Titer von anti-HBc in einer Probe wird bestimmt im Vergleich der Impulse/Minute der Probenverdünnungen zum Grenzwert. Dieser Grenzwert wird bestimmt vom Mittelwert der negativen und positiven Kontrollen.

$$\text{Grenzwert} = \frac{\overline{NKx} + \overline{PKx}}{2}$$

$\overline{NKx}$ = Mittelwert der negativen Kontrollen (Imp./Min)
$\overline{PKx}$ = Mittelwert der positiven Kontrollen (Imp./Min)

Der Titer der Probe ist die Verdünnung, deren Durchschnittszählrate fast äquivalent dem Grenzwert ist, aber nicht größer als der Grenzwert.

Leistungsfähigkeit des Verfahrens - Empfindlichkeit -

Innerhalb eines angemessenen Konzentrationsbereiches ist der Betrag von anti-HBc in einer Probe oder Verdünnung umgekehrt proportional den sich aus dem Test ergebenen Impulsen/Minute.

Eine Serumprobe wurde im menschlichen anti-HBc negativen Plasma verdünnt nach Herstellervorschrift des CORAB^{R}-Testes und fünf Wiederholungen jeder der Verdünnungen angefertigt. Wie oben angeführt, ist der Proben-Titer die Verdünnung, die dem Grenzwert fast völlig gleichwertig ist, jedoch nicht darüber hinaus geht.

In Figur Nr. 7 wurde das Ergebnis einer Probe illustriert, deren Titer 1:64 000 ist.

2.22 Verifizierung der Abbott-Aussagen

Es wurden vier Seren positiv für anti-HBc mit bekannten Titern (Endpunkt-Titer über geometrische Verdünnungsreihe) titriert, verdünnt in menschlichem anti-HBc negativem rekalzifiziertem Plasma (Pool II), und zwar wie im folgenden unter a) aufgeführten Verdünnungen mit je vier Wiederholungen und in unter b) beschriebenen Abbott-Verdünnungen mit je zwei Wiederholungen.

Serum Nr. 7

a) herkömmlich 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3 200, 1:6 400, 1:12 800

b) nach Abbott 1:100, 1:1 000, 1:10 000

Serum Nr. 14

a) herkömmlich 1:250, 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000, 1:64 000 1:128 000

b) nach Abbott 1:100, 1:1 000, 1:10 000

Serum U.

a) herkömmlich 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000, 1:64 000, 1:128 000 1:256 000, 1:512 000

b) nach Abbott 1:100, 1:1 000, 1:10 000

Serum P.

a) herkömmlich 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000, 1:64 000 1:128 000, 1:256 000

b) nach Abbott 1:100, 1:1 000, 1:10 000

Von den im Radioimmunassay ermittelten Impulsen/Minute der verschiedenen Verdünnungsstufen der vier Seren, die viermal (herkömmliche Verdünnungen) bzw. zweimal (Verdünnungen nach Abbott) getestet wurden, wurde das arithmetische Mittel bestimmt.

In dem Schaubild (Figur Nr. 8) ist die so gemittelte Impulsrate/Minute gegen die Verdünnungs-Titer graphisch aufgetragen. Dort, wo die Verdünnungskurven den eingezeichneten Grenzwert schneiden, liegt angenähert die wahre Serumkonzentration von anti-HBc.

Aus dem Schaubild ist zu ersehen, daß die 3-Punkte-Methode der Fa. Abbott sehr gut mit der ausführlichen Verdünnungsreihe übereinstimmt.

Gegenüberstellung der erhaltenen Titer:

Serum Nr. 7

vorher bekannter Titer	1:1 040
nach a) herkömmlich	1:1 060
nach b) Abbott	1:1 020

Serum Nr. 14

vorher bekannter Titer	1:8 000
nach a) herkömmlich	1:8 270
nach b) Abbott	1:7 400

Serum U.

vorher bekannter Titer	1:43 000
nach a) herkömmlich	1:38 000
nach b) Abbott	1:41 500

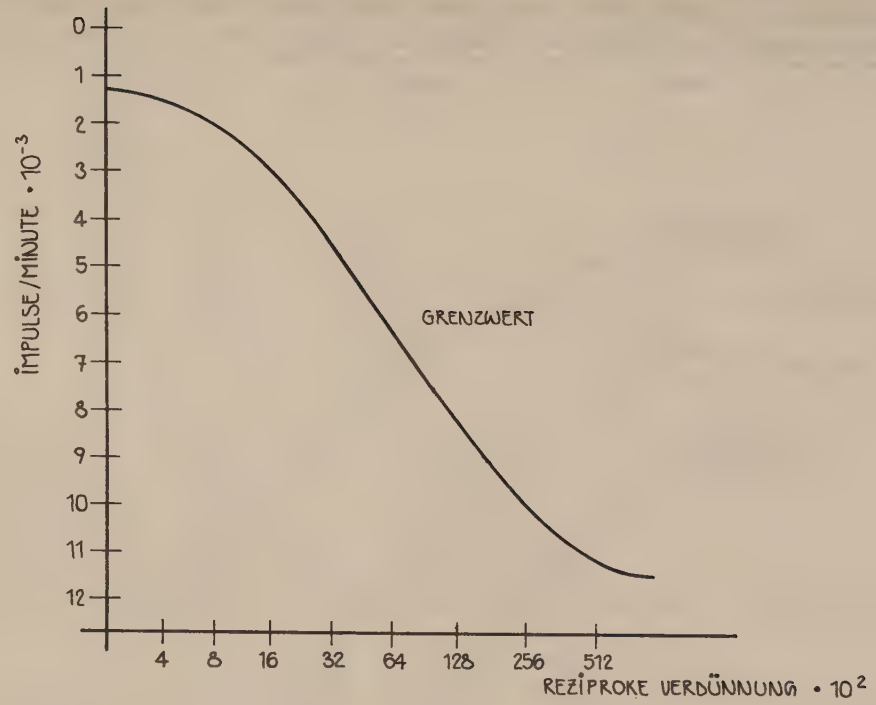
Serum P.

vorher bekannter Titer	1:21 000
nach a) herkömmlich	1:23 800
nach b) Abbott	1:25 600

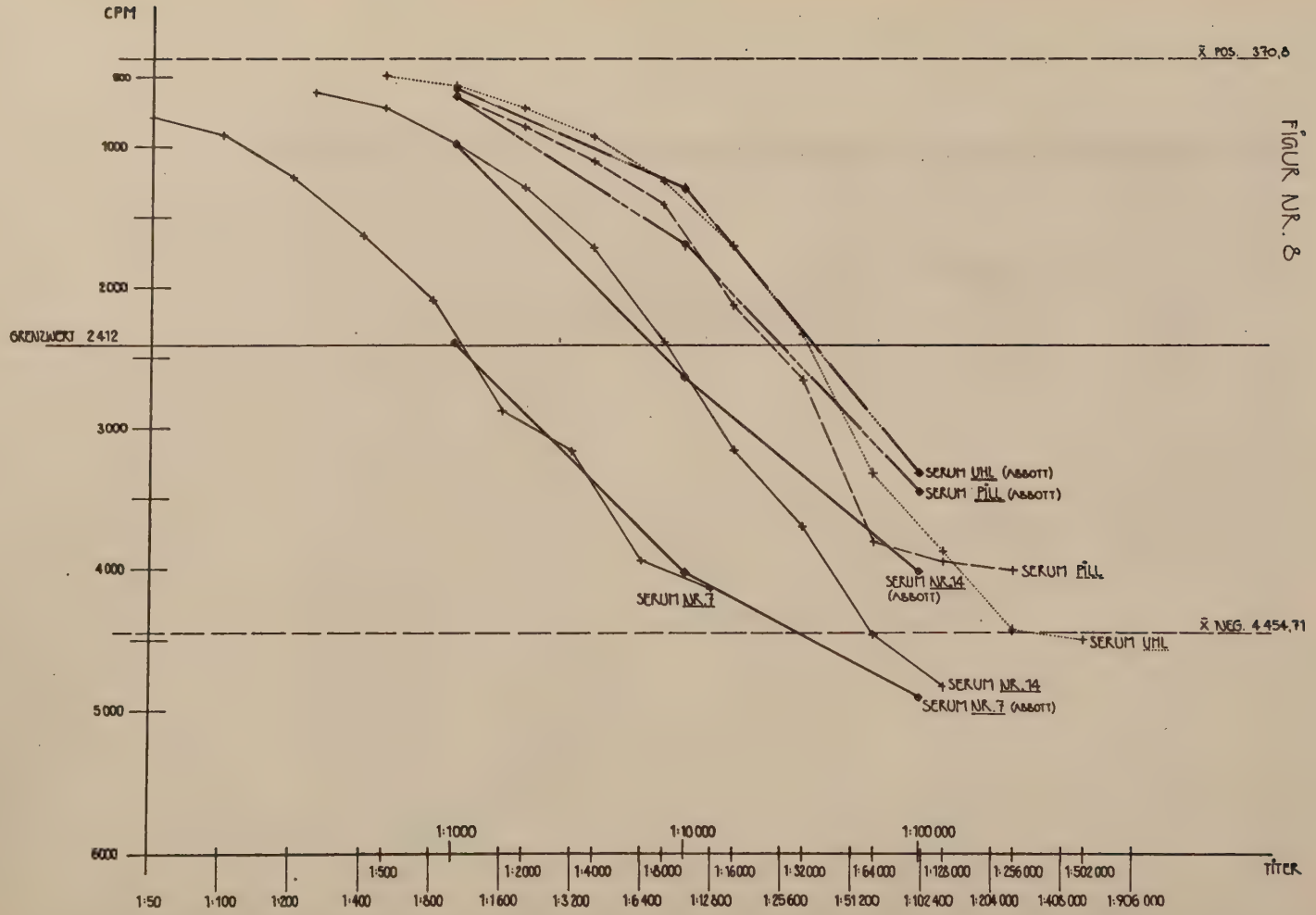
Zur Auswertung der im Screening-Test gefundenen Seren positiv für anti-HBc wurde die Methode von Abbott benutzt. Alle positiven Seren wurden somit 1:10, 1:100 und 1:1 000 verdünnt, ihre Impulse/Minute im Radioimmunassay bestimmt und graphisch aufgetragen.

Aus dem Schaubild Figur Nr. 9 ist nicht nur die graphische Ermittlung der Titer ersichtlich, sondern auch die relativ gut übereinstimmende Parallelität der einzelnen 3-Punkte-Geraden.

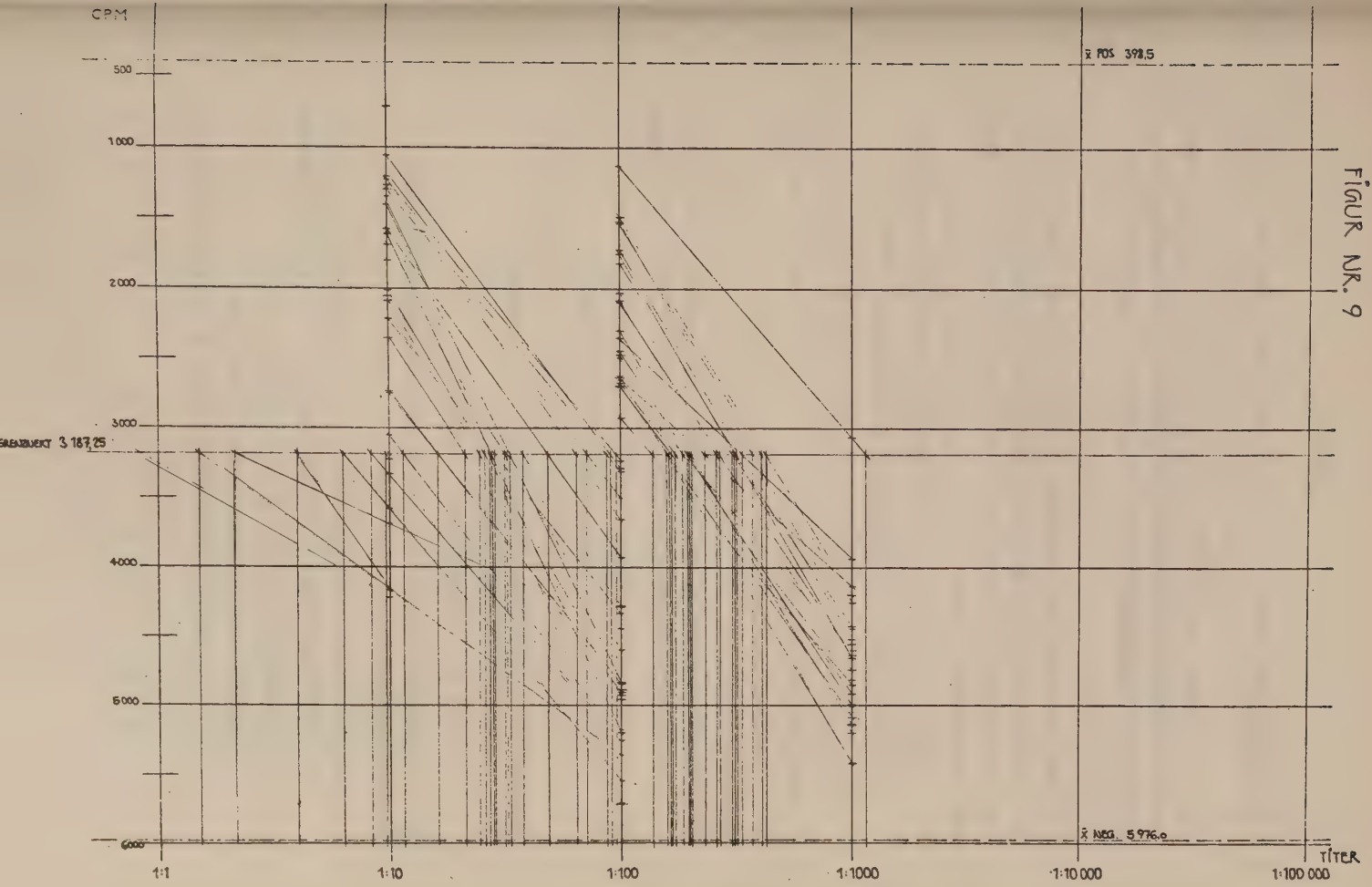
FIGUR NR. 7



TITRATION VON ANTI-HBc POSITIVEN SERUM VERDÜNNT IN ANTI-HBc NEG. KONTROLL-SERUM


CPM
x̄ POS. 370,8
1000
2000
GRENZWERT 2412
3000
4000
5000
6000
x̄ NEG. 4.454,71
SERUM UHL (ABBOTT)
SERUM PILL (ABBOTT)
SERUM PILL
SERUM NR.14 (ABBOTT)
SERUM NR.7
SERUM UHL
SERUM NR.14
SERUM NR.7 (ABBOTT)
1:1000
1:10 000
1:100 000
1:500
1:2000
1:4000
1:8000
1:16000
1:32000
1:64 000
1:128 000
1:256 000
1:502 000
TITER
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3 200
1:6400
1:12 800
1:25600
1:51 200
1:102 400
1:204 000
1:408 000
1:906 000

FIGUR NR. 8



FIGUR NR. 9

GRAPHISCHE ERMITTLUNG DER TITER VON ANTI-HBc POSITIVEN SEREN

C. ERGEBNISSE

Die in der Blutzentrale der Universität Tübingen gesammelten Seren dürften einen repräsentativen Querschnitt des allgemeinen Spenderpotentials an dieser Zentrale darstellen.

Von den ursprünglich gesammelten 3150 Proben wurden 203 Proben eliminiert, und zwar von solchen Spendern, die in dem zugehörigen Zeitraum von vier Monaten zwei- oder mehrmals gespendet hatten.

Die nunmehr verbliebenen 2948 Proben verteilen sich auf

593 weibliche, entsprechend 20,12 % und
2354 männliche, entsprechend 79,88 % Spender.

1. Qualitative Ergebnisse

Im 1. Screening-Test wurde nach Seren positiv für anti-HBs untersucht.

Von 176 gefundenen Seren positiv für anti-HBs ließen sich 166 reproduzieren, entsprechend 5,63 % aller Probanden.

Diese 166 positiven Seren teilen sich auf in
125 männliche, entsprechend 4,24 % und
41 weibliche, entsprechend 1,39 % aller Probanden.

Innerhalb der 166 positiven Seren sind demnach
75,30 % von männlichen und
24,70 % von weiblichen Spendern.

Im 2. Screening-Test wurde nach Seren positiv für anti-HBc untersucht.

Von 126 gefundenen Seren positiv für anti-HBc ließen sich 111 reproduzieren, entsprechend 3,77 % aller Probanden.

Diese 111 positiven Seren teilen sich auf in
84 männliche, entsprechend 2,85 % und
27 weibliche, entsprechend 0,92 % aller Probanden.

Innerhalb der 111 positiven Seren sind demnach
75,68 % von männlichen und
24,32 % von weiblichen Spendern.

Diese Gegenüberstellung zeigt deutlich, daß kein auffallender Unterschied zwischen beiden Geschlechtern besteht.

Von den in beiden Tests gefundenen positiven Seren waren

gleichzeitig positiv für anti-HBs und anti-HBc
109 Seren, entsprechend 3,70 % aller Probanden
nur positiv für anti-HBs
57 Seren, entsprechend 1,94 % aller Probanden
nur Positiv für anti-HBc
2 Seren, entsprechend 0,068 % aller Probanden.

In den Figuren 11, 12 und 13 sind diese Zusammenhänge graphisch dargestellt.

Die Altersverteilung der positiven Befunde sieht folgendermaßen aus:

	unter 20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60	61-65 Jahre
anti-HBs und anti-HBc	-	20	26	13	16	9	14	5	6	-
nur anti-HBs	1	12	6	9	9	7	1	8	2	2
nur anti-HBc	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-

Stellt man nun einen Gesamt-Altersquerschnitt aller getesteten Probanden auf, so ergibt sich folgendes Bild:

Von insgesamt 2947 Probanden sind in der

Altersgruppe unter 20 Jahren insgesamt 325 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 1 = 0,31 %
positiv für anti-HBc = - = -

zwischen 21-25 Jahren insgesamt 815 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 32 = 3,93 %
positiv für anti-HBc = 20 = 2,45 %

zwischen 26-30 Jahren insgesamt 540 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 32 = 5,93 %
positiv für anti-HBc = 27 = 5,00 %

zwischen 31-35 Jahren insgesamt 301 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 22 = 7,31 %
positiv für anti-HBc = 13 = 4,31 %

zwischen 36-40 Jahren insgesamt 414 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 25 = 6,04 %
positiv für anti-HBc = 16 = 3,86 %

zwischen 41-45 Jahren insgesamt 235 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 16 = 6,81 %
positiv für anti-HBc = 9 = 3,83 %

zwischen 46-50 Jahren insgesamt 158 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 15 = 9,49 %
positiv für anti-HBc = 14 = 8,86 %

zwischen 51-55 Jahren insgesamt 78 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 13 = 16,67 %
positiv für anti-HBc = 6 = 7,69 %

zwischen 56-65 Jahren insgesamt 81 Probanden
davon positiv für anti-HBs = 10 = 12,34 %
positiv für anti-HBc = 6 = 7,40 %

Im Schaubild Figur 10 sind diese Zusammenhänge graphisch dargestellt. Hieraus läßt sich die interessante Feststellung ableiten, daß mit zunehmendem Alter der prozentuale Anteil an Positiven für beide Antikörperarten steigt - wenn auch etwas weniger eindeutig für anti-HBc- und ab der Altersstufe zwischen 56-65 wieder abfällt.

2. Quantitative Ergebnisse

2.1 für anti-HBs positive Probanden

Die insgesamt 166 anti-HBs positiven Seren teilen sich in folgende Titerstufen auf: (siehe auch Figur Nr. 13)

bis	1:	10	=	31 Probanden
	1:	50	=	34 "
	1:	100	=	12 "
	1:	200	=	12 "
	1:	400	=	16 "
	1:	800	=	8 "
	1:	1 600	=	14 "
	1:	3 200	=	14 "
	1:	6 400	=	14 "
	1:	12 800	=	5 "
	1:	25 600	=	3 "
	1:	51 200	=	1 "
	1:	102 400	=	- "
	1:	204 800	=	2 "

2.2 für anti-HBc positive Probanden

Die insgesamt 111 anti-HBc positiven Seren teilen sich in folgende Titerstufen auf: (siehe auch Figur Nr. 13)

bis	1:	10	=	13 Probanden
	1:	50	=	29 "
	1:	100	=	29 "
	1:	200	=	18 "
	1:	400	=	12 "
	1:	800	=	6 "
	1:	1 600	=	3 "
	1:	3 200	=	1 "

Aus der Gegenüberstellung auf Seite 30 ist die bemerkenswerte Tatsache ersichtlich, daß die hochtitrigen anti-HBs-Seren auch immer gleichzeitig positiv für anti-HBc sind.

Ebenso verhält es sich für die positiven anti-HBc-Seren, wobei diese bis auf 3 Ausnahmen sowieso nicht sehr hochtitrig sind.

Speziell die beiden nur für anti-HBc positiven Seren haben einen niedrigen Titer, 1:25 und 1:90, d.h. also relativ niedrigtitrig. Die nur für anti-HBs positiven Seren haben keine so hohen Titer wie die, die mit anti-HBc vergesellschaftet sind.

Die Tatsache, daß bei klinisch apparenter Hepatitis B nicht immer HBs-Ag nachweisbar ist, jedoch Anti-HBc, legt den Schluß nahe, daß in diesen Fällen doch HBs-Ag vorhanden ist, und zwar in so niedriger Konzentration, daß es mit den bis jetzt bekannten Methoden nur nicht möglich ist, dieses HBs-Ag nachzuweisen. (16)

Dieses würde möglicherweise auch die beschriebene Infektiosität von nur anti-HBc positivem Blut erklären.

GEGENÜBERSTELLUNG DER ANTI-HBs UND ANTI-HBc TITER

ANTI-HBs 1:	UND ANTI-HBc 1:
700	400
800	30
4 300	50
6 200	200
90	10
40	310
34 000	200
900	30
160	3
16 500	1 200
400	230
300	90
50	20
2 000	150
6 000	200
30	10
2 700	200
30	200
5 500	30
8 200	100
2 000	160
160	400
17 400	200
1 500	260
30	300
3 400	30
5 600	30
5 300	400
10	10
3 300	400
130	30
10	30
40	200
16 100	20
800	320
2 400	30
150	80
2 900	40
300	10
1 000	10
150	200
100	200
300	350
50	70
1 350	2
40	100
30	60
350	500
1 100	80
300	100
900	90

ANTI-HBs 1:	UND ANTI-HBc 1:
200	300
8 300	80
250	80
300	10
200	10
400	160
4 800	20
10	90
800	20
10	70
1 100	30
700	110
20	70
200	40
6 100	70
2 100	10
1 800	30
1 100	2
1 900	70
40	80
1 750	4
300	160
280	80
4 800	140
15	90
2 400	20
15	620
198 000	100
900	90
6 500	50
650	170
1 550	40
2 400	100
189 000	420
7 400	90
100	800
30	90
110	80
5 300	40
1 100	50
60	1 910
10	70
80	260
290	50
5	20
15	60
210	200
1 950	50
2 680	5
6 620	35
10 600	35

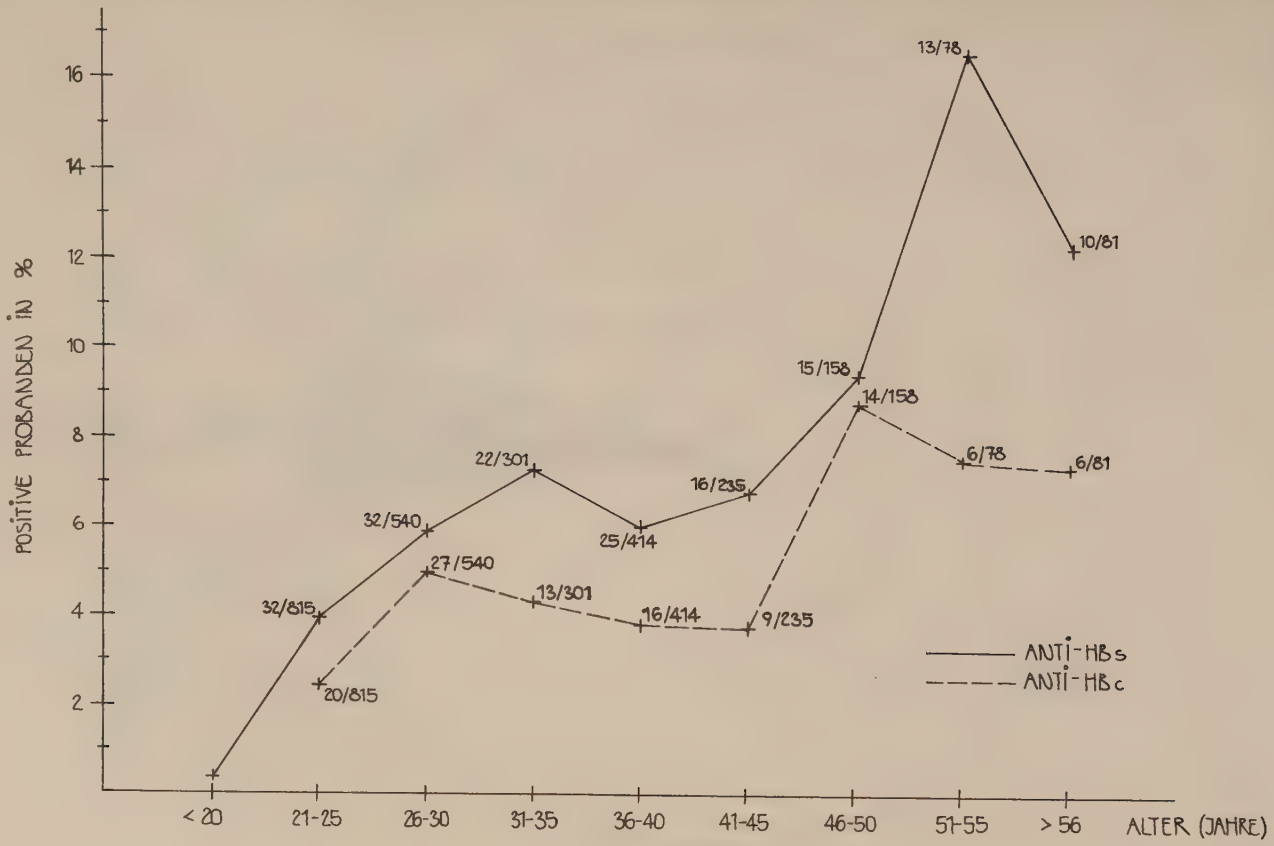
ANTI-HBs 1:	UND ANTI-HBs 1:
820	170
460	20
340	1 310
4 750	80
5	1 060
100	220
15	200

NUR ANTI-HBs TITER

1:	10	1:	10
	2		10
	80		110
	20		20
	70		35
	550		3
	20		10
	20		10
	370		1 740
	10		5
	15		3
	30		2
	5		2
	25		25
	10		10
	25		460
	10		70
	20		5
	1600		75
	50		5
	10		100
	15		10
	150		5
	2		15
	10		5
	10		200
	10		25
	60		370
	5		

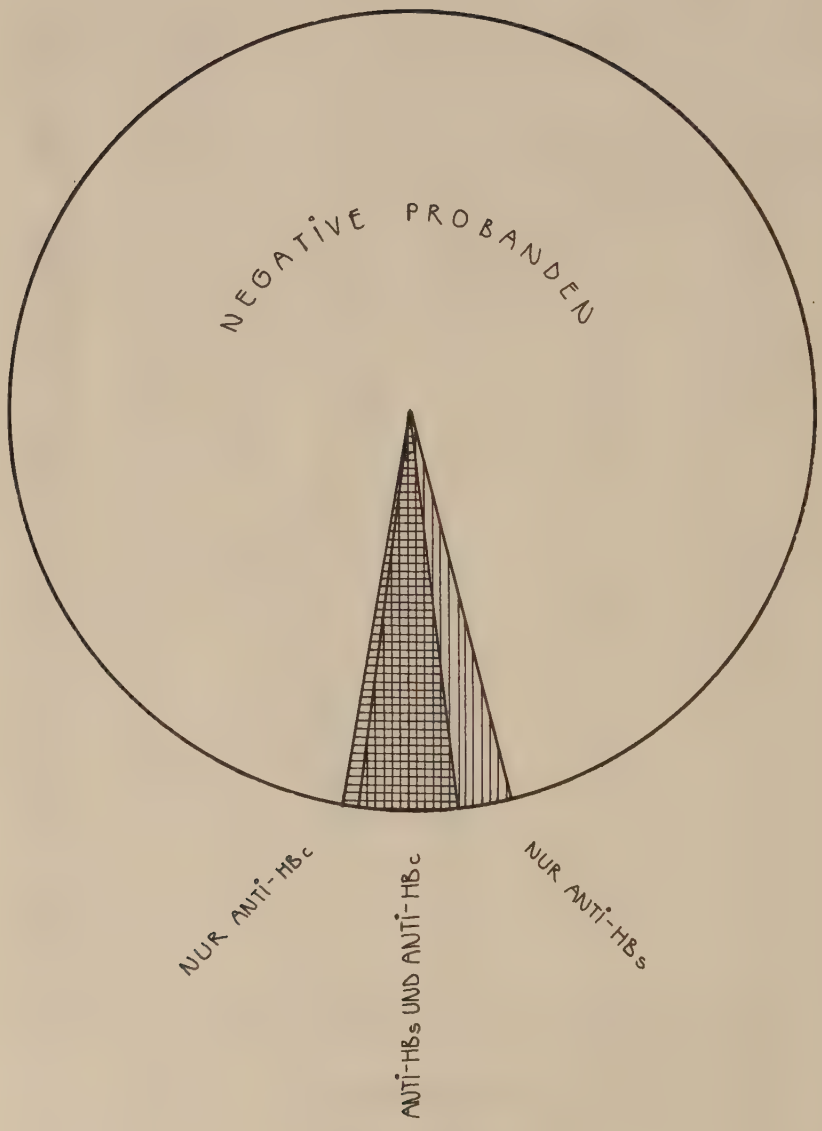
NUR ANTI-HBc TITER

1: 25 , 1: 90

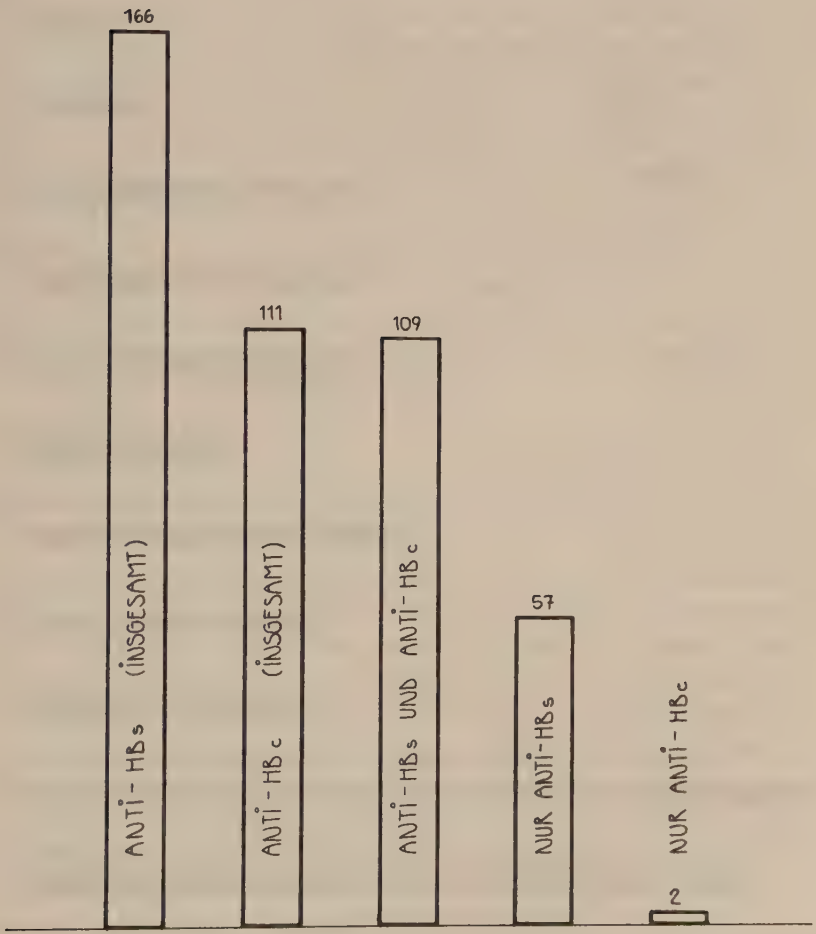

POSITIVE PROBANDEN IN %
16
14
12
10
8
6
4
2
< 20
21-25
26-30
31-35
36-40
41-45
46-50
51-55
> 56
ALTER (JAHRE)
32/815
32/540
22/301
25/414
16/235
15/158
13/78
10/81
20/815
27/540
13/301
16/414
9/235
14/158
6/78
6/81
ANTI-HBs
ANTI-HBc

FIGUR NR. 10

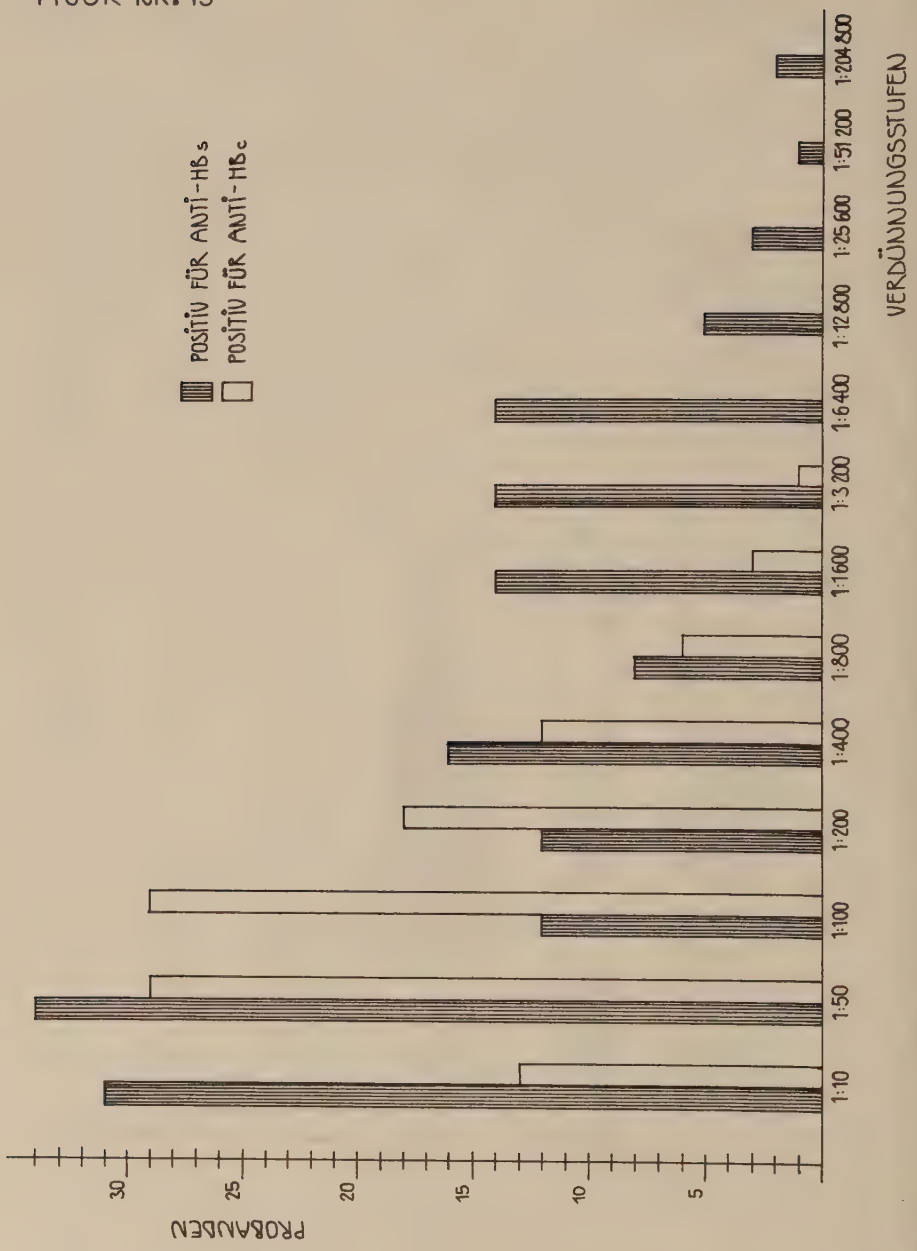
FIGUR NR.11


NEGATIVE PROBANDEN
NUR ANTI-HBc
ANTI-HBs UND ANTI-HBc
NUR ANTI-HBs

FIGUR NR. 12


166
ANTI-HBs (INSGESAMT)
111
ANTI-HBc (INSGESAMT)
109
ANTI-HBs UND ANTI-HBc
57
NUR ANTI-HBs
2
NUR ANTI-HBc

FIGUR NR. 13


POSITIV FÜR ANTI-HBs
POSITIV FÜR ANTI-HBc
PROBANDEN
30
25
20
15
10
5
1:10
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
1:6400
1:12800
1:25600
1:51200
1:204800
VERDÜNNUNGSSTUFEN

D. DISKUSSION

In zwei Screening-Test-Reihen wurde nach anti-HBs und anti-HBc gesucht. Von den 2947 Probanden waren 5,63 % positiv für anti-HBs und 3,77 % positiv für anti-HBc. Anti-HBc wurde in 65,7 % der anti-HBs positiven Seren gefunden.

Wie schon aus Figur 10 ersichtlich ist, steigt mit zunehmendem Alter auch die Prozentzahl der Probanden, die positiv für beide Antikörperarten sind. Aus der Dissertationsarbeit über das Thema: Anti-HBe und HBe-Ag in HBs-Ag negativen Blutspendern von Christiane Spaich (1979) ist zu ersehen, daß sich anti-HBe in der Altersverteilung ebenso verhält wie anti-HBs und anti-HBc. Dieser Arbeit lagen die gleichen Probanden-Seren zugrunde. Erst nach dem 56. Lebensjahr ist ein Abfall in der Häufigkeit der positiven Probanden zu beobachten. Letzteres läßt sich sicher mit der im Alter zunehmenden Defizienz des Immunsystems erklären.

Entgegen der Studie von G.N. Vyas et al (11), in der ein Nachweis von anti-HBc für nur 2 Jahre beschrieben wird, kann an Hand der Figur 10 nachgewiesen werden, daß anti-HBc wesentlich länger als 2 Jahre nachweisbar bleibt.

Im übrigen korrelieren unsere Ergebnisse gut mit Aussagen anderer Autoren. Beispielsweise entdeckten Hoofnagle und Mitarbeiter (2) durch PHA (Passive Hämagglutination) und RIA (Radioimmunassay) anti-HBs in 3-4 % der normalen Blutspendern. Anti-HBc wurde jedoch nur in 1 % der Fälle mit CF (Complement Fixation) gefunden. In dieser Arbeit wird angenommen, daß die niedrige Frequenz von anti-HBc im Verhältnis zu anti-HBs ein Abweichen des CF im Gegensatz zur Präcipitation der Antikörper des HBc-Antigen widerspiegelt oder alternativ den Unterschied zwischen den angewandten Verfahren.

Gerlich, Göttingen, legt in 2300 untersuchten Blutspenden folgende Ergebnisse vor: nur anti-HBc 0,8 %; anti-HBs und anti-HBc 2,8 %; nur anti-HBs 1,2 %. So ist in seiner Studie die Frequenz von anti-HBs 4 %, die von anti-HBc 3,6 %.

Schopp und Mitarbeiter (6) gibt in einer seiner Arbeiten die von verschiedenen anderen Untersuchern ermittelten anti-HBs-Frequenzen wieder, und zwar die von Zollikofer mit 0,26 %, von Froesner mit 6,6 % und die von Scmuness mit 6,7 %.

Eignet sich anti-HBs zum Nachweis von abgelaufenen apparenten und auch inapparenten Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus und somit zum epidemiologischen Marker für die Exposition verschiedener Bevölkerungsgruppen, so erbringt der Nachweis von anti-HBc Kenntnis über eben abgelaufene Hepatitis-Infektion, akute Hepatitis-Infektion oder chronische HBV-Infektion mit oder ohne HBs-Antigen.

Anti-HBc-Teste haben sich somit als sehr nützlich erwiesen zur Auswertung von zweideutigen HBs-Ag-Ergebnissen.(5) Beispielsweise wurde in Seren von Patienten mit HBs-Ag negativer chronischer aktiver Hepatitis anti-HBc entdeckt. Darum könnte die Lebererkrankung dieser Patienten die Folge von chronischer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus sein. Allerdings bestätigen bis jetzt nur hohe Titer von anti-HBc diese Beobachtung. Sie ist nicht unbedeutend, wenn man bedenkt, daß 10-12 % aller akuten Hepatitis-B-Fälle bei Krankenhauseinweisung HBs-Ag negativ sind.

Die Bedeutung von anti-HBc in Blutspender-Seren ist noch nicht genau geklärt. Doch stellen Hoofnagle und Mitarbeiter (13) fest, daß ein bedeutendes Risiko bestehe für Posttransfusions-Hepatitis mit anti-HBc positivem Blut, das kein anti-HBs besitzt.

In einer neueren Arbeit von Hoofnagle et al aus dem Jahre 1978 (16) wird nochmals detaillierter auf die Zusammenhänge zwischen HBs-Ag, anti-HBs und anti-HBc eingegangen:

Im Normalfall ist HBs-Ag der erste Marker einer HBV-Infektion und wird nach 1-3 Monaten Inkubationszeit gefunden. Als nächstes findet man anti-HBc, gewöhnlich 1 Monat nach Auftreten von HBs-Ag mit gleichzeitigem Erscheinen von Symptomen. Der Titer von anti-HBc steigt, solange HBs-Ag persistiert, bis zu einem gewissen Level und beginnt wieder abzufallen mit dem Abklingen bzw. Verschwinden von HBs-Ag. Anti-HBs dagegen erscheint erst nach dem Verschwinden von HBs-Ag und steigt im Titer während der Rekonvaleszenz. Das Erscheinen von anti-HBs zeigt die Gesundung von der HBV-Infektion an und eine Beendigung der Infektiosität. So bedeutet die Transfusion von anti-HBs positivem Blut kein höheres Risiko für eine Posttransfusions-Hepatitis vom Typ B. Jedoch erscheint anti-HBs nicht immer sofort nach dem Verschwinden von HBs-Ag. In 40-50 % der Fälle von klinisch apparenten Fällen von Hepatitis B ist eine Periode von einer Woche bis zu einigen Jahren beobachtet worden zwischen dem Verschwundensein von HBs-Ag und dem Erscheinen von anti-HBc.

Andere Autoren, z.B. Lander u.a. (3), gehen sogar so weit zu sagen, daß es von Nutzen sei, HBs-Ag negative Spender routinemäßig auf anti-HBc zu testen, um die Fälle von Posttransfusions-Hepatitiden weiter zu reduzieren. Aus seinen Untersuchungen geht hervor, daß Patienten, die nach Bluttransfusionen Hepatitis B entwickelten, wesentlich mehr anti-HBc positive Einheiten transfundiert bekamen als Patienten, die nach Transfusionen keine Hepatitis B entwickelten.

Bevor man allerdings daran denken kann, anti-HBc-Tests routinemäßig durchzuführen, müßte nach Hoofnagle (16) noch einiges geklärt werden: Beispielsweise müßte die Infektiosität von anti-HBc positivem Blut in weiteren klinischen Studien bestätigt werden, vor allem auch in nachkontrollierbaren Studien an Schimpansen.
Die Assoziation zwischen anti-HBc positivem Blut und der Infektiosität desselben ist schwer zu erfassen, da anti-HBc häufig mit anti-HBs kombiniert vorkommt.

Übereinstimmend wird von allen Autoren festgestellt, daß Blut, das anti-HBs und anti-HBc enthält, unbedenklich transfundiert werden kann.

Es müßte außerdem geprüft werden, ob anti-HBc-Tests vollständig HBs-Ag-Tests ersetzen könnten.

Wie man aus unseren Ergebnissen ersehen kann, sind unter den fast 3000 getesteten Blutspendern nur zwei, die nur anti-HBc positiv sind und noch dazu mit einem niedrigen Titer, so daß dieser niedrigen Frequenz kaum eine epidemiologische Bedeutung zukommt.

Bei unseren beiden nur anti-HBc positiven Blutspendern wurde bei retrospektiver Kontrolle der Empfänger keine klinisch apparente Posttransfussions-Hepatitis gefunden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird über die Untersuchungsergebnisse an ca. 3000 Blutspendern in der Blutzentrale der Universität Tübingen berichtet. Die gesammelten Seren wurden untersucht nach anti-HBs und anti-HBc. Die dabei gefundenen positiven Seren wurden erneut getestet, um ihre Positivität zu verifizieren. Anschließend wurden jeweils die Titer von anti-HBs positiven Seren und von anti-HBc positiven Seren bestimmt. Dabei scheint eine Korrelation zu bestehen zwischen hohen Titern von anti-HBs und auch relativ hohen Titern von anti-HBc. 3,7 % sind positiv für anti-HBs und anti-HBc, 1,93 % sind nur anti-HBs positiv und o,o68 % sind nur anti-HBc positiv.

Die Persistenz von anti-HBc ist ebenso wie die von anti-HBs lange Jahre nachweisbar.

Aus dem Studium anderer Autoren ergibt sich, daß Blut, welches anti-HBs enthält und Blut, das anti-HBs und anti-HBc enthält, nicht infektiös ist. Lediglich Blut, das nur anti-HBc enthält, wird möglicherweise als infektiös angesehen. Da bei den fast 3000 getesteten Spendern nur 2 gefunden wurden, die nur anti-HBc positiv sind und einen niedrigen Titer aufweisen, stellt sich für Tübingen noch nicht die akute Notwendigkeit einer routinemäßigen Testung auf anti-HBc.

Im Text angeführte Literaturstellen:

1. P. Coursaget, Ph. Manpas, A. Goudeau and J. Millmann: Automated Complement Fixationstest for the Detection of Antibodies Against the Core of Hepatitis B Virus (HBc)
J. Immunol Methods 13, 21-27 / 1976

2. B.G. Hansson: Age- and Sex-Related Distribution of Antibodies to Hepatitis B Surface and Core Antigens in a Swedish Population.
Acta Pathol Microbiol Scand 84 B, 342-346 / Dec. 1976

3. J.J. Lander, G.L. Gitnick, L.H. Gelb and R.D. Aach: Anticore Antibody Screening of Transfused Blood.
Vox Sang, 34, 77-80 / 1978

4. A.R. Neurath, W. Scmuness, C.E. Stevens, N. Strick and E.J. Harley:
Radioimmunassay and Some Properties of Human Antibodies to Hepatitis B Core Antigen.
J Gen Virol, 38, 549-559 / März 1978

5. W. Gerlich:
Natur und Nachweis der Hepatitis-Viren
Diagnostik 10, 445-449 / 1977

6. W.D. Schoppe, V. Kindler und E. Waldorf:
HBs-Antigen und Anti-HBs bei Krankenhauspersonal
Deutsche med. Wochenschr. 102, 1712-1715, 25.Nov.1977

7. W. Gerlich:
Bestimmungsmethoden der Hepatitis B-Antigene und ihrer Antikörper
Zentralbl. Bakteriol., 235, 253-264, Aug. 1976

8. W.H. Gerlich, R.M. Biswas, B. Stamm and R. Thomssen: The Diagnostical Significance of Antibodies against Hepatitis B Core Antigen.
Klin. Wochenschr. 55, 1051-1056, Nov. 1977

9. M. Kojima, K. Udo, Y. Takahashi, H. Yoshizawa, F. Tsuda, Y. Itoh, Y. Miyakawa, M. Mayumi:
Correlation between Titer of Antibody to Hepatitis B Core Antigen and Presence of Viral Antigens in the Liver.
Gastroenterology 73, 664-667/ Oct. 1977

10. M.A. Gerber, T. Zappi, S.J. Vernace and F. Paronetto:
Antibodies to Hepatitis B Core Antigen in Hepatitis B Surface Antigen-Positive and -Negative Chronic Hepatitis
J Infect Dis, 135, 1006-1009 / Jun. 1977

11. G.N. Vyas and I.M. Roberts:
Radioimmunassay of Hepatitis B Core Antigen and Antibody with Autologous Reagents.
Vox Sang 33, 369-372 / Dec. 1977

12. C.R. Howard and A.J. Zuckermann:
Core Antigen and Circulating Anti-Core Antibody in Hepatitis B Infektion
J Immunol Methods 14, 291-301 / 1977

13. J.H. Hoofnagle, R.J. Gerety, L.YNi, L.F. Barker:
Antibody to Hepatitis B Core Antigen. A Sensitive Indicator of Hepatitis B Virus Replication.
New Engl. J. Med 290, 1336-1340 / 1974

14. J.H. Hoofnagle, R.J. Gerety, L.A. Smallwood, L.F. Barker:
Subtyping of Hepatitis B Surface Antigen and Antibody by Radioimmunassay
Gastroenterology, 72, 290-296 / Feb. 1977

15. F. Blaine Hollinger, Gordon R. Dreesman, H. Fields, J.L. Melnik:
HBc Ag, anti-HBc, and DNA-Polymerase activity in transfused recipients followed prospectively
The American Journal of the Medical Sciences, 75, 343-348 / Sept.-Oct. 1975

16. J.H. Hoofnagle, L.B. Seeff, Z.B. Bales, H.J. Zimmermann and the Veterans Administration Hepatitis Cooperative Study Group:
Typ B Hepatitis after transfusion with blood containing Antibody to Hepatitis B Core Antigen
The New England Journal of Medicine, 25, 1379-1383 / June 1978

17. G. Thamer, K. Gmelin u. B. Kommerell:
Das e-Antigen
Deutsche med. Wochenschrift, 101, 1573-1575/1976

18. R.T. Schumacher:
Evaluation of Radioimmunassay Procedures für the Detection of Hepatitis B Surface Antigen
Transfusion 16 (5) 536 Sept-Oct. 1976

19. G.N. Vyas and I.M. Roberts:
Radioimmunassay of Hepatitis B Core Antigen and Antibody with Autologes Reagens
Transfusion 16 (5) 536-537 Sept.-Oct. 1976

20. G.N. Vyas, I. Roberts, D.L. Peterson and P.v. Holland:
Nonspecific Test Reactions for Antibodie to Hepatitis B Surface Antigen in chronic HBs Ag Carries.
J Lab Clin Med. 89 428-432 / Feb. 1977

21. F.B. Hollinger, G.R. Dreesman, H. Fields, J.L. Melnick:
HBc Ag, Anti HBc, and DNA Polymerase Activity in Transfused Recipients Followed Prospectiveley
Am. J. Med Sci, 270 343-348 / Sept-Oct. 1975

22. B.C. Cohen and Y.E. Cossart:
Application of a Screening Test for Antibody to Hepatitis B Core Antigen
J. Clin Pathol 30 703-713 / Aug. 1977

23. R.S. Tedder, M. Briggs: Anti-e and Rheumatoid Faktor Aktivity in Hepatitis B
Lancet, 1, 1262 - 1263 / 11. Jun. 1977

24. Y. Miyakawa:
Determination of HBc-Ag and Anti-HBc by Immune Adherence Hemagglutination and Association of HBc Ag with e-Antigen

25. M. L. Tiku, G.M. Makhdoomi, K.R. Beutner, N. Nath, P.L. Ogra:
Hepatitis B e-Antigen and Antibody Activity in Hepatitis B Virus Infektion
J. Pediatr. 91, 540-544 / Oct. 1977

26. C.G. Trepo, L.O. Magnius, R.A. Schaefer and A.M. Prince:
Detection of e Antigen and Antibody: Correlations with Hepatitis B Surface and Hepatitis B Core Antigen, Liever Disease, and Outcome in Hepatitis B Infections
Gastroenterology 71, 804-808 / Nov. 1976

27. A.R. Neurath, C. Trepo, M. Chen and A.M. Prince:
Identification of Additional Antigenic Sites on Dane Particles and the Tubular Forms of Hepatitis B Surface Antigen
J. gen. Virol, 30, 277-285 / 1976

28. P. Bories, P. Coursaget, A. Goudeau, C. Degott, P. Manpas, J.P. Benhamou:
Antibody to Hepatitis B Core Antigen in Chronic Active Hepatitis
Brit. Med. J. 1, 396-397 / 1978

29. J. Knolle, M. Born, G. Hess, O. Klinge, W. Arnold, H. Bitz u. K.H. Meyer zum Büschenfelde:
Die Charakterisierung des klinisch gesunden Hepatitis-B-Antigen (HBs Ag)-Trägers
Klin. Wschr. 54, 567-578 / 1976

30. J. Knolle:
Gibt es gesunde HBs Ag (Australia-Antigen)-Träger?
Schleswig-Holsteinisches Ärzteblatt 8 / 1977

31. K.H. Meyer zum Büschenfelde, W. Arnold und T.H. Hütteroth:
Immunologische Aspekte der Virus-Hepatitis
Internist 18, 201-207 / 1977

32. W. Arnold, G. Hess, K.H. Meyer zum Büschenfeld, W. Kösters R. Biswas, M. Strauch, J. Knolle:
Gleichzeitiges Vorkommen von Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBs Ag) und Antikörper gegen HBs Ag (Anti-HBs) verschiedenen Subtyps im Serum
Verh Dtsch Ges Im Med 82, 405-407 / 1976

33. P. Skinhoj:
Hepatitis and Hepatitis B-Antigen in Greenland
II: Occurrence and Luterrelation of Hepatitis B Associated Surface, Core, and 'e' Antigen-Antibody Systems in Highly Endemic Area
Am J Epidemiol 105, 99-106 / Feb. 1977

34. B. Forghani, N.J. Schmidt, E.H. Lennette:
Radioimmunassay Inhibition Method for Confirmung the Specificity of Positive Hepatitis B Surface Antigen Reactions and for Survey of Antibodies to the Antigen
Vox Sang 32, 125-130 / 1977

Lebenslauf

Am 16.8.1941 wurde ich, Brigitte Ewald, als sechstes Kind des Fritz, Walter Ewald und der Charlotte, Fridericke, Auguste Ewald, geborene Herrmann, in Görlitz geboren.

Von 1947 - 1955 besuchte ich in Potsdam die Grundschule bis zum Abschluß derselben.

1955 begann ich eine Lehre als technische Zeichnerin für Hochbau in Potsdam. Nachdem wir im Februar 1957 legal nach Mannheim übersiedelten, konnte ich im Juli 1959 die Lehre im Architekturbüro daselbst mit dem Gesellenbrief abschließen.

Im September 1959 begann ich mit dem Ingenieurstudium an der Staatsbauschule Darmstadt (Fachrichtung Hochbau). Im März 1963 legte ich das Staatsexamen als Hochbau-Ingenieur ab.

Anschließend war ich etwa 10 Jahre in verschiedenen Architektur- bzw. Ingenieurbüros tätig. Während dieser Zeit besuchte ich das Abendgymnasium in Stuttgart.

Im Oktober 1973 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen.

Am 7.10.1980 und 20.10.1980 legte ich dann den letzten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.